饲粮中添加叶酸和维生素 B_{12} 对五龙鹅生长性能、屠宰性能、脂肪沉积及长链脂肪酸伸长酶 7 基因表达量的影响

王宝维　程漫漫　孔　敏　张名爱　岳　斌　葛文华

（青岛农业大学优质水禽研究所，国家水禽产业技术体系营养与饲料功能研究室，青岛 266109）

摘　要：本试验旨在探究饲粮中添加不同水平叶酸和维生素 B_{12}（VB_{12}）对五龙鹅生长性能、屠宰性能、脂肪沉积及长链脂肪酸伸长酶 7（*ELOVL7*）基因表达量及不同组织器官中表达差异性的影响及相关性分析。试验选用 5 周龄五龙鹅 420 只，随机分为 7 组，每组 6 个重复，每个重复 10 只鹅，公母各占 1/2，Ⅰ~Ⅵ组为试验组，Ⅶ组为对照组。试验采用 2×3 两因素交叉等重复的析因设计，饲粮中叶酸的添加水平分别为 0.25、2.00 mg/kg，VB_{12} 的添加水平分别为 0.003、0.009、0.018 mg/kg，试验期为 4 周。采用 Real-time PCR 技术测定五龙鹅肝脏中 *ELOVL*7 基因的表达量，并选取对照组的五龙鹅，检测 *ELOVL*7 基因在心脏、肝脏、肾脏、腹脂、肺、肌胃、腺胃、胸肌、腿肌、脾脏、胰腺 11 个部位的表达分布情况。结果表明：1）饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 的交互作用对五龙鹅末重影响显著（$P<0.05$），Ⅴ组体重最大，对平均日增重、料重比影响不显著（$P>0.05$）。2）饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 的交互作用对血清甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）和低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）含量影响显著($P<0.05$)。饲粮中添加不同水平叶酸对血清 TG 和 LDL-C 含量影响显著($P<0.05$)；不同水平 VB_{12} 对血清葡萄糖（GLU）和 LDL-C 含量影响显著($P<0.05$)。3）饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 交互作用对胸肌率影响显著($P<0.05$)，对屠宰率、半净膛率、全净膛率和腿肌率影响均不显著($P>0.05$)。Ⅰ、Ⅴ组胸肌率显著高于对照组($P<0.05$)。4）饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 交互作用对皮脂率、腹脂率、肌间脂带宽、胸肌肌内脂肪和腿肌肌内脂肪影响显著($P<0.05$)；Ⅴ组腹脂率显著低于其他各组($P<0.05$)。5）饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 的交互作用对肝脏中 *ELOVL*7 基因的表达量影响显著（$P<0.01$）；饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 均能使肝脏中 *ELOVL*7 基因的表达量高于对照组，Ⅴ组表达

收稿日期：2018-04-19

基金项目：国家水禽产业技术体系专项基金(CARS-42-13)；山东省良种工程（2014lz039）

作者简介：王宝维（1959-），男，教授，研究生导师，研究方向为动物营养与保健。E-mail: wangbw@qau.edu.cn

量最高，显著高于对照组(P<0.05)。6）肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与屠宰率呈显著负相关（P<0.05），与血清 TG、LDL-C 含量呈显著负相关（P<0.05），与血清总胆固醇（TC）含量呈极显著负相关（P<0.01），与肌间脂带宽呈显著正相关（P<0.05），与皮脂率、腹脂率、腿肌肌内脂肪率呈显著负相关（P<0.05）。7）*ELOVL7* 基因在腹脂中的表达量最高，其次是肺和胰腺，在胸肌、腿肌中的表达量较低。在本试验条件下：1）饲粮中添加适宜水平的叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅 *ELOVL7* 基因表达、脂类代谢生化指标和机体营养组成有显著干预作用；2）叶酸 0.25 mg/kg 和 VB_{12} 0.009 mg/kg 组合（Ⅴ组）最佳。

关键词：叶酸；VB_{12}；*ELOVL7* 基因；脂肪沉积；鹅

中图分类号: S823　　　　　　文献标识码:A　　　　　　文章编号：

鹅脂肪合成的主要场所在肝脏，体内脂肪的合成与分解都是通过一系列的酶促反应来完成的，这个过程受到饲粮营养成分、内分泌激素、相关酶和相关基因等的调节[1]，因此，从分子的层面上研究肝脏脂类代谢的机理有着重要意义。长链脂肪酸伸长酶 7（very long chain fatty acid elongase 7，*ELOVL7*）是调控花生酸的强候选基因。花生酸参与机体脂肪酸代谢循环，是机体内重要的饱和脂肪酸。Yang 等[2]利用 282 头苏太猪进行全基因组关联分析，鉴别影响花生酸的候选基因是位于 16 号染色体上的 *ELOVL7* 基因。研究表明，过量的摄入脂肪会促进 *ELOVL7* 基因过表达，导致前列腺癌细胞的增长，敲除 *ELOVL7* 基因后，前列腺癌细胞则会衰减[3]。因此，*ELOVL7* 基因可能是阐明脂肪摄入量与前列腺癌关联的关键因素[4]，维生素 B_{12}（VB_{12}）作为一碳代谢的辅酶，可以提高叶酸利用率，促进多种 DNA 合成等反应。叶酸、VB_{12} 是对神经系统发育和维持生理正常功能起重要作用的维生素，是同型半胱氨酸（Hcy）代谢的必需辅助因子，大量研究显示，补充叶酸、VB_{12} 能降低体内 Hcy 水平和脑血管疾病发生的危险性[5]。Stekol 等[6]研究了 VB_{12} 和叶酸在大鼠体内胆碱合成中的作用，结果表明 VB_{12} 缺乏减少了甘氨酸的利用，叶酸缺乏减少了丝氨酸的利用，较小程度地减少了甘氨酸的利用，这 2 种氨基酸能够形成乙醇胺，进而合成胆碱。已有研究表明，饲粮中不同水平的营养物质可使禽肉的脂肪酸组成和含量发生变化，而脂肪酸的合成受 *ELOVLs* 基因家族的调控。在家禽上对于 *ELOVL*1-6 基因的研究较常见，关于鸡的 *ELOVL7* 结构的研究已经取得了一些进展，而 *ELOVL7* 基因在鹅脂肪代谢过程中的功能和机理研究还处于空白。叶酸与 VB_{12} 组合应用的研究多见于医学报道，而在家禽营养学上的研究基本处于空白。本

试验开展了饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量的影响及 *ELOVL7* 基因在五龙鹅不同组织器官中的表达差异性研究，丰富了营养物质调控鹅脂肪酸代谢以及脂肪酸延伸酶基因 *ELOVLs* 家族的研究内容，旨在从分子水平上探明饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量、不同组织器官中表达差异性、脂肪沉积等的影响规律。

1　材料与方法

1.1　试验材料及饲粮

叶酸含量 96%，VB_{12} 含量 1%，均由宁夏金维制药股份有限公司生产。按照试验设计要求，将叶酸和 VB_{12} 按添加比例混入载体中，并逐级搅入全价料中，再放入搅拌机混合 6 min。

基础饲粮以美国 NRC 标准(1994)[7]为主要参考依据，其组成及营养水平见表 1。采用高效液相色谱法测得基础饲粮中叶酸和 VB_{12} 含量分别为 0.40 和 0.00 mg/kg。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

原料 Ingredients	含量 Content	营养水平 Nutrient levels2)	含量 Content
玉米 Corn	57.00	代谢能 ME/（MJ/kg）	11.43
豆粕 Soybean meal	18.27	粗蛋白质 CP	15.86
菜籽粕 Rapeseed meal	4.00	粗纤维 CF	5.12
玉米秸秆 Corn straw	15.00	钙 Ca	1.04
玉米干酒糟及其可溶物 Corn DDGS	2.00	有效磷 AP	0.32
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.00	胱氨酸 Cys	0.38
石粉 Limestone	2.00	赖氨酸 Lys	0.83
食盐 NaCl	0.23	蛋氨酸 Met	0.26
微量元素 Trace elements1)	0.20	维生素 B_{12} VB_{12}/(mg/kg)	0.00

多维 Multivitamin[1]	0.30	叶酸 Folic acid/(mg/kg)	0.40
合计 Total	100.00		

[1] 多维和微量元素（不含叶酸和 VB_{12}）为每千克饲粮提供 The multivitamin and trace elements (without folic acid and VB_{12}) provided the following per kg of the diet： VA 1 500 mg，VD_3 200 IU，VE 12.5 mg，VK_3 1.5 mg，VB_1 2.2 mg，VB_2 5.0 mg，烟酸 nicotinic acid 65 mg，VB_6 2 mg，生物素 biotin 0.2 mg，泛酸 pantothenate 15 mg，胆碱 choline 1 000 mg，Fe 85 mg，Cu 5 mg，Mn 80 mg，Zn 80 mg，I 0.42 mg，Se 0.3 mg，Co 2.5 mg。

[2] 叶酸和 VB_{12} 为实测值，其他为计算值。Folic acid and VB_{12} were measured values，while others were calculated values.

1.2 试验设计及饲养管理

试验用鹅由国家水禽产业技术体系育种基地高密银河润雁鹅业有限公司提供。选择初始平均体重差异不显著（$P>0.05$）的 5 周龄五龙鹅 420 只，随机分为 7 组，每组 6 个重复，每个重复 10 只鹅，公母各占 1/2， Ⅰ~Ⅵ组为试验组，Ⅶ组为对照组。试验采用 2×3 两因素交叉等重复的析因设计，对照组饲喂基础饲粮（不添加叶酸和 VB_{12}）,试验组在基础饲粮中分别添加 0.25、2.00 mg/kg 叶酸，0.003、0.009、0.018 mg/kg VB_{12}，试验设计详见表 2。试验期为 4 周。

表 2 试验设计

Table 2 Experimental design

项目 Items	组别 Groups					
	I	II	III	IV	V	VI
维生素 B_{12} VB_{12}/（mg/kg）	0.003	0.009	0.018	0.003	0.009	0.018
叶酸 Folic acid/（mg/kg）	0.25	2.00	0.25	2.00	0.25	2.00

试验前鹅舍要进行彻底全面的消毒，防止疾病的传播。采用网床平养，试验鹅自由饮水和采食，少喂勤添。搞好鹅舍内环境卫生，保持地面洁净干燥。观察鹅的健康状况，做好疾病防控工作。

1.3 样品采集与测定

1.3.1　生长性能测定

试验鹅第 8 周龄末，停饲 12 h，逐只空腹称重，统计各组试验鹅的始重、末重和增重情况，计算平均日增重（ADG）和料重比（F/G）。

1.3.2　血清脂类代谢指标测定

试验鹅第 8 周龄末，各重复随机选择 2 只鹅，公母各占 1/2，肉鹅停饲 12 h 后，颈静脉采血，于离心机 3 000 r/min 离心 15 min，将分离的血清分装于 1.5 mL 的离心管置于-20 ℃冰箱中保存待测。

血清中葡萄糖(GLU)、总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量均由试剂盒进行测定，试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3.3　屠宰性能测定

试验鹅第 8 周龄末，各重复随机选择 2 只鹅，公母各占 1/2，肉鹅停饲 12 h 后，颈静脉放血致死，测定屠宰性能指标包括屠体重、半净膛重、全净膛重、胸肌重、腿肌重，按照《家禽生产性能名词术语和度量统计方法》[8]测定，并计算屠宰率、半净膛率、全净膛率、胸肌率、腿肌率。

1.3.4　脂肪沉积测定

试验鹅第 8 周龄末，各重复随机选择 2 只鹅，公母各占 1/2，肉鹅停饲 12 h 后，颈静脉放血致死，用湿法拔毛沥干水分后称重，测量腹脂重、皮脂重、皮脂厚、肌间脂带宽，按照《家禽生产性能名词术语和度量统计方法》[8]测定，计算腹脂率、皮脂率、胸肌肌内脂肪率、腿肌肌内脂肪率。

1.3.5　基因表达量测定

试验鹅第 8 周龄末，各重复随机选择 2 只鹅，公母各占 1/2，颈静脉放血致死后剖开腹腔，无菌操作取出组织样品（心脏、肝脏、肾脏、腹脂、肺、肌胃、腺胃、胸肌、腿肌、脾脏、胰腺等），迅速收集到冻存管液氮保存，转移到-80 ℃冰箱保存待测。

选取肝脏样品 50 mg，加入 1 mL 的 TRNzol(Roche)试剂，粉碎匀浆后抽提 RNA。使用 Bio-Photometer 型核酸蛋白测定仪测定其浓度和纯度，将检验合格的 RNA 用反转录试剂盒逆转录成 cDNA 用于基因表达量试验。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL：SybrGreen qPCR Master Mix 10 μL，上、下游引物（10 μmol/L）各 0.4 μL|，DNA 模板 2.0 μL，ddH_2O

7.2 μL。PCR 程序为：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 60 s，72 ℃修复延伸 7 min，35 个循环。同样对心脏、肾脏、腹脂、肺、肌胃、腺胃、胸肌、腿肌、脾脏、胰腺组织样品进行 RNA 逆转录为 cDNA，用于基因组织表达差异性试验。

根据 NCBI 鹅 *ELOVL7*（NW_013185694.1）基因登录号，引物序列由 Primer 5.0 软件设计，以 3-磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase，*GAPDH*）为内参基因，引物由生工生物（上海）有限公司合成。基因引物序列见表 3。

每个样品设置 3 个重复，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各样本中 *ELOVL7* 基因相对于内参基因 *GAPDH* 的表达量。

表 3　基因引物序列

Table 3　Gene primer sequences

基因 Genes	引物序列 Primer sequence (5′→3′)	产物大小 Product size/bp	退火温度 Annealing temperature/℃
长链脂肪酸伸长酶 7 *ELOVL7*	F:CAGCCTATCATAAATACTTGTGGTG R: GGTAGTCGTTGTCCCTTTGTGT	220	58.3
3-磷酸甘油醛脱氢酶 *GAPDH*	F: TCCAAGGAGTAAGCCAAGCA R: GGGAGACAGAAGGGAACAGAA	135	58.4

1.4　统计分析

利用 SPSS 17.0 软件中 GLM 模型分析主效应和互作效应，用 ANOVA 和 LSD 法对数据进行差异显著性分析。$P<0.05$ 为差异显著。

2　结果与分析

2.1　饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对 5~8 周龄五龙鹅生长性能的影响

由表 4 可见，饲粮中添加不同水平的叶酸和 VB_{12} 的交互作用对五龙鹅末重影响显著（$P<0.05$），试验Ⅴ组体重最大，对平均日增重、料重比影响不显著（$P>0.05$）；Ⅴ组的末重显著高于Ⅰ、Ⅵ和Ⅶ组($P<0.05$)。与对照组（Ⅶ组）相比，饲粮中添加不同水平的叶酸和 VB_{12} 有提高平均日增重的趋势，但差异不显著（$P>0.05$）。由此表明，饲粮中添加不同水平的叶酸和 VB_{12} 对 5~8 周龄五龙鹅生长性能产生影响，其中，添加叶酸 0.25 mg/kg 和 VB_{12} 0.009 mg/kg（Ⅴ组）对生长性能影响最显著。

表 4　饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对 5~8 周龄五龙鹅生长性能的影响

Table 4　Effects of dietary different levels of folic acid and VB_{12} on growth performance of *Wulong* geese at 5 to 8 weeks of age

项目 Items	组别 Groups							SEM	*P* 值 *P*-value		
	I	II	III	IV	V	VI	VII		叶酸 Folic acid	维生素 VB_{12} VB_{12}	互作 Interaction
始重 Initial weight/g	1 079.10	1 135.90	1 113.20	1 126.40	1 178.64	1 101.50	1 127.10	24.32	ns	ns	ns
末重 Final weight/g	2 336.70^{c}	2 426.70^{ab}	2 600.00^{ab}	2 560.00^{ab}	2 643.30^{a}	2 368.00^{c}	2 380.00^{c}	41.42	ns	ns	0.02
平均日增重 ADG/g	45.22	46.13	53.10	51.24	52.32	45.11	44.73	1.15	ns	ns	ns
料重比 F/G	5.12	5.04	5.02	5.20	5.14	5.08	5.05	0.08	ns	ns	ns

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著(P＞0.05)，不同小写字母表示差异显著(P＜0.05)。ns=not significant。下表同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.2 饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅血清脂类代谢指标的影响

由表 5 可见，饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 的交互作用对血清 TG、HDL-C 和 LDL-C 含量影响显著($P<0.05$)。饲粮中添加不同叶酸水平对血清 TG 和 LDL-C 含量影响显著($P<0.05$)；不同水平 VB_{12} 对血清 GLU 和 LDL-C 含量影响显著($P<0.05$)。与对照组相比，饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 有降低血清中脂类代谢指标的趋势。由此表明，饲粮中添加叶酸和 VB_{12} 能够改善五龙鹅血清脂类代谢指标。

表 5　饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅血清脂类代谢指标的影响

Table 5　Effects of dietary different levels of folic acid and VB_{12} on serum lipid metabolism indexes of *Wulong* geese

mmol/L

项目 Items	组别 Groups							SEM	*P* 值 *P*-value		
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ		叶酸 Folic acid	维生素 VB_{12} VB_{12}	互作 Interaction
葡萄糖 GLU	12.68^{a}	12.63^{a}	12.78^{a}	12.81^{a}	11.13^{b}	12.48^{ab}	12.93^{a}	0.12	ns	0.03	ns
总胆固醇 TC	3.17	3.20	3.22	3.03	3.06	3.21	3.26	0.02	ns	ns	ns
甘油三酯 TG	0.41	0.43	0.40	0.38	0.39	0.41	0.42	0.00	0.04	ns	<0.01
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C	1.98^{b}	1.89^{bc}	1.71^{bc}	1.76^{bc}	1.59^{c}	1.82^{bc}	2.03^{a}	0.03	ns	ns	<0.01
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C	1.83^{b}	2.11^{a}	1.84^{b}	1.83^{b}	1.85^{b}	2.04^{ab}	2.15^{a}	0.02	<0.01	0.02	0.03

2.3 饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅屠宰性能的影响

由表 6 可见，饲粮中添加叶酸和 VB_{12} 交互作用对胸肌率影响显著($P<0.05$)，对屠宰率、半净膛率、全净膛率和腿肌率影响均不显著($P>0.05$)。Ⅰ、Ⅴ组胸肌率显著高于对照组($P<0.05$)。由此表明，饲粮中添加叶酸和 VB_{12} 能够提高五龙鹅胸肌率，减少腹脂率，改变了鹅胴体组织成分构成。

表 6　饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅屠宰性能的影响

Table 6　Effects of dietary different levels of folic acid and VB_{12} on slaughter performance of *Wulong* geese　　%

项目 Items	组别 Groups							SEM	*P* 值 *P*-value		
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ		叶酸 Folic acid	维生素 VB_{12} VB_{12}	互作 Interaction
屠宰率 Dressing percentage	86.08	87.57	85.85	87.15	88.79	87.62	86.35	0.31	ns	ns	ns
半净膛率 Percentage of half-eviscerated yield	81.21	85.03	81.59	84.42	82.43	82.05	80.58	0.68	ns	ns	ns
全净膛率 Percentage of eviscerated yield	70.23	73.56	72.37	71.70	70.59	71.57	69.88	0.66	ns	ns	ns
胸肌率 Percentage of breast muscle	9.22[a]	9.06[ab]	9.04[ab]	9.07[ab]	9.17[a]	8.92[b]	8.98[b]	0.03	0.01	ns	0.02
腿肌率 Percentage of leg muscle	15.00	14.84	15.11	14.41	14.68	14.75	14.50	0.13	ns	ns	ns

2.4　饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅脂肪沉积的影响

由表 7 可见，饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 交互作用对皮脂率、腹脂率、肌间脂带宽、胸肌肌内脂肪和腿肌肌内脂肪影响显著($P<0.05$)。其中，Ⅴ组腹脂率显著低于其他各组($P<0.05$)。饲粮中添加不同叶酸和 VB_{12} 水平对皮脂厚无显著影响($P>0.05$)。由此表明，饲粮中添加叶酸和 VB_{12} 能够降低五龙鹅脂肪沉积量。

表 7　饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅脂肪沉积的影响

Table 7　Effects of dietary different levels of folic acid and VB_{12} on fat deposition of *Wulong* geese

项目 Items	组别 Groups							SEM	*P* 值 *P*-value		
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ		叶酸 Folic acid	维生素 VB_{12} VB_{12}	互作 Interaction
皮脂率 Subcutaneous fat percentage/%	12.84^{ab}	13.51^{a}	13.02^{ab}	12.42^{ab}	11.88^{b}	11.96^{b}	12.75^{ab}	0.14	<0.01	ns	0.01
腹脂率 Abdominal fat percentage/%	2.73^{a}	2.70^{a}	2.89^{a}	2.55^{ab}	2.22^{b}	2.66^{a}	2.86^{a}	0.04	0.04	<0.01	<0.01
肌间脂带宽 Fat strip width/mm	9.55^{ab}	9.40^{abc}	9.87^{a}	8.95^{cd}	9.21^{bcd}	8.98^{cd}	8.80^{d}	0.06	ns	ns	<0.01
皮脂厚 Subcutaneous fat thickness/mm	3.01	3.24	2.94	3.08	2.78	3.02	3.12	0.03	ns	ns	ns
胸肌肌内脂肪率 IMF percentage in the breast muscle/%	6.89^{bc}	6.38^{c}	8.27^{a}	7.47^{b}	6.73^{bc}	6.90^{bc}	7.79^{b}	0.13	0.02	<0.01	<0.01
腿肌肌内脂肪率 IMF percentage in the leg muscle/%	7.38^{bc}	7.22^{bc}	7.45^{bc}	7.77^{b}	6.79^{c}	8.02^{a}	8.17^{a}	0.09	ns	0.03	0.04

2.5 饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量的影响

由表 8 可见，饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 的交互作用对肝脏中 *ELOVL7* 基因的表达量影响显著（$P<0.01$）；饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 均能使肝脏中 *ELOVL7* 基因的表达量高于对照组，Ⅴ组 *ELOVL7* 基因的表达量最高，显著高于对照组($P<0.05$)。

表 8　饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量的影响

Table 8　Effects of dietary different levels of folic acid and VB_{12} on *ELOVL7* gene expression level in the liver of *Wulong* geese

项目 Item	组别 Groups							SEM	*P* 值 *P*-value		
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ		叶酸 Folic acid	维生素 VB_{12}	互作 Interaction VB_{12}
长链脂肪酸伸长酶 7 *ELOVL7*	0.288^{bc}	0.119^{c}	0.148^{c}	0.347^{b}	0.569^{a}	0.239^{bc}	0.116^{c}	0.015	0.03	<0.01	<0.01

2.6 肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与血清脂类代谢的相关性

由表 9 可知，肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与血清 TG、LDL-C 含量呈显著负相关（$P<0.05$），与 TC 含量呈极显著负相关（$P<0.01$）；与血清 GLU、HDL-C 含量呈负相关，但不显著（$P>0.05$）。由此表明，肝脏中 *ELOVL7* 基因表达对血清脂类代谢具有调控作用，二者之间存在着同步反向调控机制。

表 9　肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与血清脂类代谢的相关性

Table 9　Correlation of *ELOVL7* gene expression level in the liver and lipid metabolism

项目 Item	血糖 GLU	总胆固醇 TC	甘油三酯 TG	高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C	低密度脂蛋白胆固醇

					LDL-C
ELOVL7 基因表达量 Expression level of *ELOVL7* gene	-0.169	-0.653**	-0.557*	-0.372	-0.522*

*表示显著相关（P<0.05），**表示极显著相关（P<0.01）。下表同。

* means significant correlation（P<0.05）, and ** means extremely significant correlation（P<0.01）. The same as below.

2.7 肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与屠宰性能的相关性

由表 10 可知，肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与屠宰率呈显著正相关（P<0.05），与半净膛率、全净膛率、腿肌率呈负相关，但不显著（P>0.05），与胸肌率呈正相关，但不显著（P>0.05）。由此表明，肝脏中 *ELOVL7* 基因表达对五龙鹅的屠宰性能具有一定调控作用。

表 10 肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与屠宰性能的相关性

Table 10 Correlation of *ELOVL7* mRNA expression level in the liver and slaughter performance

项目 Item	屠宰率 Dressing percentage	半净膛率 Percentage of half-eviscerated yield	全净膛率 Percentage of eviscerated yield	胸肌率 Percentage of breast muscle	腿肌率 Percentage of leg muscle
长链脂肪酸伸长酶7基因表达量 *ELOVL7* gene expression level	0.449*	-0.127	-0.248	0.127	-0.053

2.8 肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与脂肪沉积的相关性

由表 11 可知，肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与肌间脂带宽呈显著正相关（P<0.05），与皮脂率、腹脂率、腿肌肌内脂肪率呈显著负相关（P<0.05），与皮脂厚呈正相关（P>0.05）。由此可见，肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与鹅机体脂肪的沉积密切相关，饲粮中添加叶酸和 VB_{12} 可通过调控肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量来改善体内脂肪分配。

表 11　肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与脂肪沉积的相关性

Table 11　Correlation of *ELOVL7* gene expression level in the liver and fatty deposition

项目 Item	皮脂率 Percentage of subcutaneous fat	腹脂率 Percentage of abdominal fat	胸肌肌内脂肪率 IMF percentage in the breast muscle	腿肌肌内脂肪率 IMF percentage in the leg muscle	皮脂厚 Subcutaneous fat thickness	肌间脂带宽 Fat strip width
长链脂肪酸伸长酶 7 基因表达量 *ELOVL7* gene expression level	-0.435*	-0.471*	-0.273	-0.352*	0.241	0.387*

2.9　*ELOVL7* 基因组织表达差异

由图 1 可见，*ELOVL7* 基因在鹅的心脏、肝脏、肾脏、腹脂、肺、肌胃、腺胃、胸肌、腿肌、脾脏、胰腺中均有表达，表达量由高到低依次为腹脂>肺>胰腺>肾脏>腺胃>心脏>肌胃>脾脏>肝脏>腿肌>胸肌。*ELOVL7* 基因在腹脂中的表达量最高，在心脏、肝脏、肌胃、脾脏、胸肌、腿肌中的表达量差异不显著(P>0.05)。

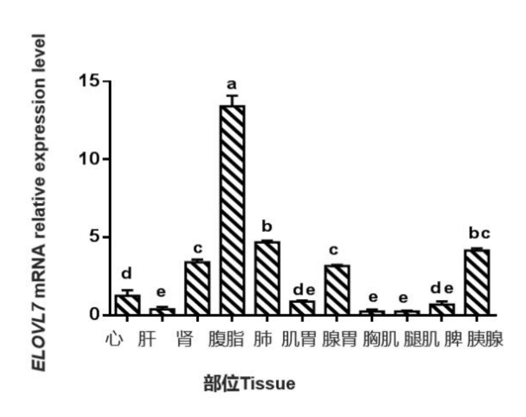


图 1　*ELOVL7* 基因在五龙鹅不同组织中的表达量

Fig.1　Expression level of *ELOVL7* gene in different tissues of *Wulong* geese

3　讨　论

3.1　饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅生长性能和屠宰性能的影响

叶酸和 VB_{12} 是合成 DNA、RNA 的重要辅酶，对生命早期的生长发育非常重要，它们的缺乏是引起巨幼红细胞贫血的主要因素，孕期母体叶酸缺乏可导致胎儿发生神经管畸形[9]。不同叶酸水平的添加对肉仔鸡的生产性能有一定影响。随着叶酸添加水平的提高，肉仔鸡的饲料转化效率和日增重都在提高，表明叶酸作为快速生长的现代品系肉仔鸡体内合成嘌呤、嘧啶的必需物质和有效的甲基载体可促进机体的生长发育[10]。齐广海[11]报道，生长速度快的动物，对叶酸的需要量会提高。所以添加适宜计量的叶酸将能提高现代品系肉仔鸡的生长速度。本试验结果表明，饲粮中添加适宜水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅胸肌率和腹脂率影响显著，和对照组相比，致使胸肌率增加，腹脂率降低，这表明肝脏中 *ELOVL7* 基因表达对五龙鹅的屠宰性能具有一定调控作用。由此可以推断，饲粮中添加适宜水平叶酸和 VB_{12} 能够改变鹅肉营养组成。

3.2　饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量的影响

Stabler 等[12]研究表明，叶酸缺乏和 VB_{12} 缺乏都可引起恶性贫血，叶酸补给虽然可以缓解因 VB_{12} 缺乏造成的恶性贫血，但却引起神经系统的损伤。甲基丙乙醇和总的 Hcy 浓度是特异性诊断 VB_{12} 缺乏的敏感指标，也是和叶酸缺乏有效区分开的指标。VB_{12} 在机体内主要通过 2 种物质吸收和转运，包括内源因子和钴胺转运蛋白。所以，VB_{12} 实际上与核酸和蛋白质的合成密切相关[13]。VB_{12} 依赖的是蛋氨酸合成酶，能催化一个甲基基团从甲基四氢叶酸上转移至 Hcy，形成蛋氨酸，最终形成活性氨基酸（SAM）。缺乏 VB_{12} 将减少 DNA 甲基

化的 SAM 可利用量，从而影响其基因表达[14]。VB_{12} 影响着叶酸的代谢效率，并且参与嘌呤和核苷酸的合成，同时维持 DNA 的合成与修复，保证染色体的稳定性。本试验结果表明，饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅肝脏中 *ELOVL*7 基因表达量有显著的影响，V 组 *ELOVL*7 基因的表达量最高，体重值也最大，配制肉禽饲粮时值得借鉴。本试验主要是为了研究叶酸和 VB_{12} 联合对家禽肝脏 *ELOVL*7 基因表达量的影响，探明该基因对机体组织营养再分配的影响规律，为家禽的肉质研究提供理论依据；关于 *ELOVL*7 基因表达对脂肪酸代谢的机理还有待于继续深入研究。

3.3　五龙鹅肝脏中 *ELOVL*7 基因表达量与血清脂类代谢指标的相关性

脂肪酸是细胞的基本组成部分，在机体的能量存储、信息传递及代谢调控等方面起着重要的作用。脂肪酸是由一条长的线性碳氢链(疏水尾)和一个末端梭基(亲水头)组成的梭酸[15]。根据其碳氢链内是否含有双键又可分饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸 2 类。高含量的单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸，如人体内必需脂肪酸ω-3 系列，其有利于人类的心血管健康，然而高含量的饱和脂肪酸则会增加得心脏疾病的风险[16]。因此，脂肪酸是维持机体内的内稳态重要成分。研究表明，*ELOVL*7 主要参与饱和脂肪酸的合成，*ELOVL*1、*ELOVL*3 及 *ELOVL*7 共同完成 C18:0、C20:0、C22:0、C24:0 合成途径[17]。本试验结果表明，肝脏中 *ELOVL*7 基因表达量与血清 TG、LDL-C 含量呈显著负相关，与血清 TC 含量呈极显著负相关，与血清 GLU、HDL-C 含量呈负相关，但差异不显著。这表明肝脏中 *ELOVL*7 基因对血清脂类代谢具有抑制调控作用，可以推断，饲粮中添加叶酸和 VB_{12} 可通过提高肝脏中 *ELOVL*7 基因表达量来改善机体脂肪代谢。

3.4　五龙鹅肝脏中 *ELOVL*7 基因的表达量与脂类沉积的相关性

花生酸参与机体脂肪酸代谢循环，是人体内重要的饱和脂肪酸。就目前所知，*ELVOL*7 是调控花生酸的强候选基因[18]。目前，关于 *ELOVL*7 基因在脂类代谢中的研究多见于猪、小鼠和水产动物，而在鹅上的研究基本处于空白，其作用机制尚不明确。本试验肝脏中 *ELOVL*7 基因表达量与脂肪沉积的相关性分析结果表明，肝脏中 *ELOVL*7 基因表达量与肌间脂带宽呈显著正相关，与皮脂率、腹脂率、腿肌肌内脂肪率呈显著负相关。这可以推断饲粮中添加叶酸和 VB_{12} 能直接影响肝脏中 *ELOVL*7 基因表达，进一步影响鹅机体脂肪分配，初步探明了遗传与营养因子（叶酸和维生素 B_{12} 联合）的关系。

3.5 *ELOVL7* 基因表达量在五龙鹅组织表达特异性

ELOVLs 是极长链脂肪酸延伸酶家族基因，最早来源于酵母 ELO[19]。迄今，已在生物体内识别并鉴定出 7 种 ELOVL 蛋白 ELOVLl~7，其中 ELOVL1，ELOVL3，ELOVL6，ELOVL7 主要参与饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸的合成，而 ELOVL2，ELOVL4，ELOVL5 主要参与与多不饱和脂肪酸的合成[20]。有关研究表明，ELOVLs 家族是超长链脂肪酸延长关键步骤的催化剂[18]。*ELOVLs* 基因家族在动物体内具有重要的表达调控作用[21]。杨志刚等[22]对中华绒螯 *ELOVLs* 基因表达分析显示，各组织中均有 *ELOVL* 基因表达，表达量最高的组织为肝胰腺和肠道，在心脏中表达量最低。敲除癌细胞中 *ELOVL7* 基因能有效减少细胞中 C20、C22 和 C24 脂肪酸的含量，并直接影响癌细胞生长[3]。本试验结果表明，*ELOVL7* 基因在腹脂中的表达量最高，在腺胃、心脏、脾脏、胸肌、腿肌中的表达量较低且差异不显著，这表明 *ELOVL7* 基因在鹅不同组织中的表达量不同，该结果丰富了家禽脂肪酸延伸酶基因 *ELOVLs* 家族的研究内容，为进一步深入探究 *ELOVLs* 家族的表达特点奠定基础。

4 结 论

① 饲粮中添加不同水平叶酸和 VB_{12} 对五龙鹅肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量有干预作用，饲粮中添加叶酸 0.25 mg/kg 和 VB_{12} 0.009 mg/kg 使肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量最高。饲粮适宜的叶酸和 VB_{12} 组合能够提高五龙鹅胸肌率，减少腹脂率，改变了鹅酮体组织成分构成。

② 肝脏中 *ELOVL7* 基因表达对五龙鹅血清脂类代谢具有调控作用，二者之间存在着同步反向调控机制。

③ 肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与屠宰率呈显著正相关，与半净膛率、全净膛率、腿肌率呈负相关，与胸肌率呈正相关，这表明肝脏中 *ELOVL7* 基因的表达量对五龙鹅屠宰性能产生影响。肝脏中 *ELOVL7* 基因表达量与肌间脂带宽呈显著正相关，与皮脂率、腹脂率、腿肌肌内脂肪率呈显著负相关。*ELOVL7* 基因在腹脂中的表达量最高，其次是肺和胰腺；*ELOVL7* 基因在胸肌、腿肌中的表达量较低。

参考文献：

[1] 弓彦.鹅 *FAS*、*OBR*、*THRSPa* 和 *Apo-AI* 基因多态性及 *FAS* 和 *Apo-B* 基因在填饲鹅中表达模式的研究[D].硕士学位论文.南京:南京农业大学,2011:23–25.

[2] YANG B,ZHANG W C,ZHANG Z Y,et al.Genome-wide association analyses for fatty acid composition in porcine muscle and abdominal fat tissues[J].PLoS One,2013,8(6):e65554.

[3] TAMURA K,MAKINO A,HULLIN-MATSUDA F,et al.Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism[J].Cancer Research,2009,69(20):8133–8140.

[4] 章峰,李景,黄路生,等.苏太猪 ELOVL7 基因的生物信息学分析[J].生物信息学,2014,12(4):242–248.

[5] 刘欢,黄国伟.叶酸、维生素 B_{12}、B_6 与神经退行性疾病[J].大津医科大学学报,2005,11(4):650–653.

[6] STEKOL J A,WEISS S,WEISS K W.Vitamin B_{12} and folic acid in the synthesis of choline in the rat[J].Archives of Biochemistry and Biophysics,1952,36(1):5–10.

[7] NRC.Nutrient requirements of poultry[S].9th ed.Washington,D.C:National Academy Press,1994.

[8] 陈宽维,高玉时,王志跃,等.中华人民共和国农业行业标准 家禽生产性能名词术语和度量统计方法[J].中国禽业导刊,2006(15):45–46.

[9] 柳桢,杨振宇,荫士安.母乳中叶酸与维生素 B_{12} 研究进展[J].卫生研究,2013,42(2):331–335.

[10] 鲁建伟.日粮中添加叶酸和甜菜碱对肉仔鸡生理生化和生产性能影响的研究[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2000.

[11] 齐广海. 动物叶酸营养的研究进展[J]. 饲料广角, 1993(2):22–24.

[12] STABLER S P,LINDENBAUM J,ALLEN R H.The use of homocysteine and other metabolites in the specific diagnosis of vitamin B_{12} deficiency[J].The Journal of Nutrition,1996,126(4):1266S–1272S.

[13] PUFULETE M,AL-GHNANIEM R,KHUSHAL A,et al.Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma[J].Gut,2005,54(5):648–653.

[14] 郭满盈,葛丽卫,杨伟平.胃癌患者血清同型半胱氨酸、叶酸及维生素 B_{12} 水平的初步探讨[J].检验医学,2010,25(2):95,106.

[15] JAKOBSSON A,WESTERBERG R,JACOBSSON A.Fatty acid elongases in

mammals:their regulation and roles in metabolism[J].Progress in Lipid Research,2006,45(3):237–249.

[16] SIMOPOULOS A P.The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids[J].Biomedicine & Pharmacotherapy,2002,56(8):365–379.

[17] MOON Y A,SHAH N A,MOHAPATRA S,et al.Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins[J].Journal of Biological Chemistry,2001,276(48):45358–45366.

[18] NAGANUMA T,SATO Y,SASSA T,et al.Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase *ELOVL*7[J].FEBS Letters,2011,585(20):3337–3341.

[19] 王海燕,苏玉虹.编码极长链脂肪酸延长酶基因家族的结构及其产物的功能[J].生命的化学,2005,25(1):29–31.

[20] DENIC V,WEISSMAN J S.A molecular caliper mechanism for determining very long chain fatty acid length[J].Cell,2007,130(4):663–677.

[21] MANDAL M N,AMBASUDHAN R,WONG P W,et al.Characterization of mouse orthologue of ELOVL4:genomic organization and spatial and temporal expression[J].Genomies,2004,83(4):626–635.

[22] 杨志刚,施秋燕,成永旭,等.中华绒螯蟹脂肪酸延长酶(*ELOVL*)基因全长 cDNA 的克隆及其表达分析[J].中国水产科学,2016,23(1):53–63.

Effects of Dietary Folic Acid and Vitamin B_{12} on Growth Performance, Slaughter Performance, Fat Deposition and *ELOVL*7 Gene Expression Level of *Wulong* Goose

WANG baowei CHENG manman KONG min ZHANG mingai YUE bin GE wenhua

(*Institute of High Quality Waterfowl, Qingdao Agricultural University, Nutrition and Feed Function Laboratory of National Waterfowl Industrial Technology System, Qingdao* 266109, *China*)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of dietary folic acid and vitamin B_{12} (VB_{12}) on growth performance, slaughter performance, fat deposition, very long chain fatty acid

elongase 7 (*ELOVL7*) expression level and expression difference in different tissues of *Wulong* geese, and to analyze the correlation. A total of 420 *Wulong* geese at 5 weeks of age were randomly divided into 7 groups. Each group had 6 replicates and each replicate consisted of 5-male and 5-female geese. Groups Ⅰ to Ⅵ were experimental groups，and group Ⅶ was a control group. The trial used a 2 × 3 factorial crossover design. The amounts of folic acid were 0.25, 2.00 mg/kg and the amounts of VB_{12} were 0.003、0.009、0.018 mg/kg. The experiment lasted for 4 weeks. The Real-time PCR was used to test the *ELOVL7* gene expression level in the liver of *Wulong* geese in groups, and those in the control group was selected to detect *ELOVL7* gene expression in 11 tissues of heart, liver, kidney, abdominal fat, lung, muscle stomach, gland stomach, chest, leg muscle, spleen and pancreas. The results showed as follows: 1) the interaction of dietary different levels of folic acid and VB_{16} had a significant effect on final weight of *Wulong* geese (P<0.05）, the weight of group Ⅴ was the highest, and had no significant effect on average daily gain and feed to gain ratio （P>0.05）. 2) The interaction of dietary different levels of folic acid and VB_{16} had significant effects on the contents of triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in serum (P<0.05）. Dietary different levels of folic acid had significant effects on the contents of TG and LDL-C in serum (P<0.05）, and dietary different levels of VB_{12} had significant effects on the contents of glucose (GLU) and LDL-C in serum (P<0.05）. 3) The interaction of dietary different levels of folic acid and VB_{16} had a significant effect on the percentage of breast muscle (P<0.05）, and had no significant effects on dressing percentage, percentage of half-eviscerated yield, percentage of eviscerated yield and percentage of leg muscle (P>0.05). The percentage of breast muscle in groups Ⅰ, Ⅴ was significantly higher than that in control group (P<0.05). 4) The interaction of dietary different levels of folic acid and VB_{16} had significant effects on subcutaneous fat percentage, abdominal fat percentage, fat strip width, intramuscular fat (IMF) percentage in the breast muscle and IMF percentage in the leg muscle (P<0.05), and the subcutaneous fat percentage in group Ⅴ was significantly lower than that in other groups (P<0.05). 5) The interaction of dietary different levels of folic acid and VB_{16} had a significant effect on *ELOVL7*

gene expression level in the liver （*P*<0.01）; dietary different levels of folic acid or VB_{16} could increase *ELOVL7* gene expression level in the liver compared with the control group (*P*<0.05). 6) The *ELOVL7* gene expression level in the liver was significantly negative correlated with dressing percentage （*P*<0.05）, TG and LDL-C contents in serum （*P*<0.05）, total cholesterol （TC） content in serum （*P*<0.01）, subcutaneous fat percentage, abdominal fat percentage, IMF percentage in the leg muscle （*P*<0.05）, and was significantly positive correlated with fat strip width （*P*<0.05）. 7）The *ELOVL7* gene expression level in the liver was the highest in abdominal fat percentage, and followed by the lung and pancreas, and that in the leg muscle and breast muscle was the lowest. In conclusion, 1) Dietary different levels of folic acid and VB_{12} significantly altered the expression of *ELOVL7* gene, lipid metabolism biochemical indexes and organic nutrient composition of *Wulong* geese; 2) the folic acid 0.25 mg/kg and VB_{12} 0.009 mg/kg (group Ⅴ) is the best combination.

Key words: folic acid; VB_{12}；*ELOVL7* gene； fat deposition； geese

Author, WANG baowei, professor, E-mail: wangbw@qau.edu.cn （责任编辑 陈 鑫）